

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 05/05/2027.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS ARAÇATUBA

AMANDA DE OLIVEIRA FURLAN

**Análise de microRNAs exossomais em lavado uterino de
gestações produzidas por inseminação artificial e
fertilização *in vitro***

ARAÇATUBA

2021

AMANDA DE OLIVEIRA FURLAN

**Análise de microRNAs exossomais em lavado uterino de
gestações produzidas por inseminação artificial e
fertilização *in vitro***

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal)

Orientadora: Pesquisadora Dra. Flávia Lombardi Lopes

Coorientadora: Profa. Dra. Danila Barreiro Campos

ARAÇATUBA

2021

F985a Furlan, Amanda de Oliveira
Análise de microRNAs exossomais em lavado uterino de gestações produzidas por inseminação artificial e fertilização in vitro / Amanda de Oliveira Furlan. -- Araçatuba, 2021
185 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba
Orientadora: Flávia Lombardi Lopes
Coorientadora: Danila Barreiro Campos

1. Exossoma. 2. microRNA. 3. Reprodução Assistida. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

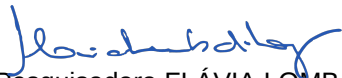
Título: Análise de microRNAs Exossomais em Lavado Uterino de Gestações Produzidas por Inseminação Artificial e Fertilização In Vitro

AUTORA: AMANDA DE OLIVEIRA FURLAN

ORIENTADORA: FLÁVIA LOMBARDI LOPES

COORIENTADORA: DANILA BARREIRO CAMPOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

A handwritten signature in blue ink, which appears to read "Flávia Lombardi Lopes", is positioned above the printed name of the researcher.

Pesquisadora FLÁVIA LOMBARDI LOPES (Participação Virtual)

Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI (Participação Virtual)

Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. ELIANE PATRÍCIA CERVELATTI (Participação Virtual)

Curso de Ciencias Biológicas / Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium / UniSALESIANO - Araçatuba

Araçatuba, 04 de maio de 2021.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Análise de microRNAs Exossomais em Lavado Uterino de Gestações Produzidas por Inseminação Artificial e Fertilização In Vitro

AUTORA: AMANDA DE OLIVEIRA FURLAN

ORIENTADORA: FLÁVIA LOMBARDI LOPES

COORDINADORA: DANILA BARREIRO CAMPOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Pesquisadora FLÁVIA LOMBARDI LOPES (Participação Virtual)
Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

A handwritten signature in blue ink, reading "Giselle Zoccal Mingoti", is placed over the text of the second reviewer.

Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI (Participação Virtual)
Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. ELIANE PATRÍCIA CERVELATTI (Participação Virtual)
Curso de Ciências Biológicas / Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium / UniSALESIANO - Araçatuba

Araçatuba, 04 de maio de 2021.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Análise de microRNAs Exossomais em Lavado Uterino de Gestações Produzidas por Inseminação Artificial e Fertilização In Vitro

AUTORA: AMANDA DE OLIVEIRA FURLAN

ORIENTADORA: FLÁVIA LOMBARDI LOPES

COORIENTADORA: DANILA BARREIRO CAMPOS

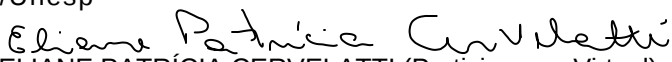
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Pesquisadora FLÁVIA LOMBARDI LOPES (Participação Virtual)

Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI (Participação Virtual)

Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Profa. Dra. ELIANE PATRÍCIA CERVELATTI (Participação Virtual)

Curso de Ciências Biológicas / Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium / UniSALESIANO - Araçatuba

Araçatuba, 04 de maio de 2021.

“Deus, por meio do seu poder que age em nós, pode realizar muito mais do que pedimos ou imaginamos; a Ele seja dada a glória na Igreja e em Jesus Cristo por todas as gerações, para sempre. Amém!”

Efésios 3,20-21

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pelo seu amor incondicional, e por me mostrar que seus planos e sonhos são maiores do que sonhei ou imaginei.

A minha família, em especial aos meus pais, pelo incentivo, inúmeros conselhos e por todo o amor, eu não seria quem sou hoje se não fosse por eles. A minha irmã e melhor amiga, que sempre acreditou em mim e lutava junto comigo nas situações difíceis, era ela que me ajudava a levantar todas as vezes que eu duvidava que ia conseguir. A meu noivo e melhor amigo, por seu amor, paciência, incentivo e pelo apoio durante todo esse período, obrigada por viver esse sonho junto comigo.

A minha orientadora, Profa. Dra. Flávia Lombardi Lopes, pela grande oportunidade de fazer parte do seu laboratório de Epigenômica, e pelo seu suporte e incentivo. Obrigada pelo carinho, nunca irei esquecer de como fui acolhida. Palavras não são suficientes para descrever toda a minha felicidade e gratidão.

As minhas amigas de laboratório: Beatriz Trigo, Flávia Athayde, Jéssica Troiano, Juliana Felix, Maria Fernanda, Mariana Cordeiro, Natália Scaramele e Nayra Herrera, que além de grandes amigas também me transmitiram inúmeros conhecimentos. Obrigada pelas conversas, alegrias e conselhos durante esse período, vocês são incríveis.

A UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (UNESP/FMVA), pela oportunidade de realização do mestrado.

A coorientadora deste trabalho, Profa. Dra. Danila Campos, e a Universidade Federal do Paraíba, pela parceria e parte do financiamento.

A minha banca de qualificação e defesa, Prof. Dr. Guilherme, Profa. Dra. Gisele e Profa. Dra. Eliane, que tenho grande admiração. Obrigada pelas contribuições dadas ao meu trabalho.

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

“Não tente se tornar uma pessoa de sucesso, tente se tornar uma pessoa de valor”.

Albert Einstein

FURLAN, A. O. **Análise de microRNAs exossomais em lavado uterino de gestações produzidas por inseminação artificial e fertilização *in vitro***. 2021. 185. f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi investigar a modulação dos miRNAs exossomais em lavado uterino de vacas não-lactantes por meio de gestações produzidas por inseminação artificial (IA) e fertilização *in vitro* (FIV) aos 18 e 32 dias de prenhez, com a finalidade de compreender o papel dos miRNAs na comunicação materno-fetal, bem como identificar os possíveis fatores envolvidos na perda da gestação após a fertilização *in vitro*. Coletamos o fluido uterino de vacas aos 18 e 32 dias de gestação, produzidos por ambos os métodos de reprodução assistida. O RNA total foi extraído para a análise de microtranscriptoma pelo método de microarranjo. Os genes-alvo foram identificados para todos os miRNAs diferencialmente expressos, e o enriquecimento de vias foi realizado. Aos 18 dias, 12 miRNAs tinham aumento de expressão para o grupo FIV e 8 para o grupo IA. Aos 32 dias, 5 miRNAs, estavam com a expressão aumentada no grupo FIV e 8 no grupo IA. Com a análise de enriquecimento, 61 vias foram obtidas, incluindo algumas relacionadas com a implantação prejudicada, reabsorção fetal e restrição de crescimento intrauterino aos 18 e 32 dias em FIV. Nossos dados focaram no período de pré-implantação (18 dias) e pós-implantação (32 dias), sugerindo que as alterações na expressão dos miRNAs exossomais pós-FIV podem ocasionar falhas na comunicação materno-fetal aos 18 dias e com adesão e crescimento aos 32 dias, contribuindo para alguns dos problemas frequentemente encontrados em gestações de fertilização *in vitro*.

Palavras-chave: Exossoma. microRNA. Reprodução assistida.

FURLAN, A. O. **Analysis of exosomal microRNAs in uterine flushes of pregnancies produced by artificial insemination and *in vitro* fertilization**. 2021. 185. f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

ABSTRACT

The aim of the present study was to investigate the modulation of exosomal miRNAs in uterine flushes of cows non-lactating through pregnancies produced by artificial insemination (AI) and in vitro fertilization (IVF) at 18 and 32 days pregnancy, for the purpose of understanding the role of miRNAs in maternal-fetal communication, as well as identifying possible factors involved in pregnancy failure following IVF. We collected uterine fluid from indicine cows at 18 and 32 days of pregnancy, produced by both assisted reproductive methods. Total RNA was extracted for microtranscriptome analysis by microarray. Target genes were identified for all differentially expressed miRNAs, and pathway enrichment analysis was performed. At 18 days, 12 microRNAs had increased expression in the IVF group and 8 in the AI group. At 32 days, 5 microRNAs were up-regulated in the IVF group and 8 in the AI group. Following enrichment analysis, 61 pathways were obtained, including pathways related to impaired implantation, fetal resorption and intrauterine growth restriction at 18 and 32 days in IVF. Our data, focused on the pre-implantation (18 days) and post-implantation (32 days) stages, suggests that altered exosomal miRNA expression post-IVF may lead to failures in fetal-maternal communication at 18 days and adhesion, growth at 32 days, thus contributing to some of the problems commonly seen in IVF pregnancies.

Keywords: Assisted reproduction. Exosome. microRNA.

LISTA DE FIGURAS

- Figure 1 - Grouping pattern Heatmap between miRNAs DE at A) 18 and at B) 32 days of gestation. Heatmap3 in RStudio (Version 1.2.5033) was used with grouping pattern from “complete linkage” and the matrix distance with Euclidean measure 26
- Figure 2 - Target genes of miRNAs up-regulated at 18 days (IVF x AI), organized according to their ontology 28
- Figure 3 - Target-genes of miRNAs down-regulated at 18 days (IVF x AI), organized according to their ontology 28
- Figure 4 - Target-genes of miRNAs up-regulated at 32 days (IVF x AI), organized according to their ontology 29
- Figure 5 - Target-genes of miRNAs down-regulated at 32 days (IVF x AI), organized according to their ontology 29

LISTA DE TABELAS

Table 1 - Expression of up- and downregulated miRNAs in the uterine fluid at 18 and 32 days of pregnancy (IVF x AI)	25
Table 2 - Canonical pathways analysis of target genes of up- and downregulated miRNAs at 18 and 32 days of pregnancy (IVF x AI)	30

APÊNDICE A – REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ÁVILA, A. et al. Extracellular vesicles and its advances in female reproduction. *Animal Reproduction*, v. 16, n. 1, p. 31–38, 2018.

BAUERSACHS, S.; WOLF, E. Uterine Responses to the Preattachment Embryo in Domestic Ungulates: Recognition of Pregnancy and Preparation for Implantation. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 3, n. 1, p. 489–511, 2015.

LI, F. et al. Causative effects of genetically-determined high maternal/fetal endothelin-1 on preeclampsia like conditions in mice. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 3, p. 139–148, 2019.

LIANG, J.; WANG, S.; WANG, Z. Role of microRNAs in embryo implantation. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2017.

SHARKEY, A. M.; MACKLON, N. S. The science of implantation emerges blinking into the light. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 27, n. 5, p. 453–460, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.08.005>>.

WAHID, F. et al. MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1803, n. 11, p. 1231–1243, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.06.013>>.

ZHANG, J. et al. Extracellular vesicles in normal pregnancy and pregnancy-related diseases. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 24, n. 8, p. 4377–4388, 2020.